

METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE ESPECTROFOTÔMETROS: ANÁLISE DA DISPERSÃO DAS MEDIDAS

Cleonilde Maria do Nascimento^{1*}, Carla Luiza Barros Bernardes Borja¹, Bruno Edberg Alves de Lira¹, Jabson Herber Profiro de Oliveira², Dijanah Cota Machado³, Milton Marcelino Filho³

¹Monitor da disciplina de Física e Biofísica-UFPE, ²Mestrado em Inovação Terapêutica-UFPE,

³Departamento de Biofísica e Radiobiologia-UFPE

*cl.manasci@gmail.com

INTRODUÇÃO

A investigação científica na área das ciências da vida, associada aos conhecimentos da química e da física, permitiu o desenvolvimento de inúmeras técnicas e metodologias analíticas (CISTERNAS; VARGAS; MONTE, 2005). A espectrofotometria está entre estas técnicas e é amplamente utilizada em laboratórios de análises clínicas e laboratórios de pesquisa, principalmente nas investigações bioquímicas, físicas, químicas e farmacológicas (CERRI *et al.*, 2017). A espectrofotometria, juntamente com a fotocolorimetria, é um método biofísico que se baseia na relação existente entre a absorção de luz e a concentração de uma substância em solução, permitindo determinar as concentrações de espécies químicas diversas, como carboidratos, proteínas, lipídios, colesterol entre outras (HIRANO *et al.*, 2001). No âmbito clínico, a análise quantitativa de biomoléculas presentes nos fluidos biológicos (urina, plasma ou soro) é essencial para a compreensão de disfunções metabólicas desencadeadas por alguma patologia.

Por meio da espectrofotometria, aplicada às análises clínicas e por outras tecnologias, diretrizes da área médica foram sendo estabelecidas para a condução de um diagnóstico mais consistente e assertivo, possibilitando assim um encaminhamento terapêutico eficaz (CERRI *et al.*, 2017).

Além das inúmeras aplicações nas análises clínicas e na pesquisa científica, a espectrofotometria pode ser também aplicada na área odontológica. O espectrofotômetro está entre os instrumentos mais precisos, úteis e de fácil utilização para mensuração de cor, sendo capaz de fornecer o espectro de emissão de luz dos dentes vitais ou extraídos e dos materiais restauradores (DIESEL, 2011).

A espectrofotometria também é utilizada em diversos setores da indústria, principalmente têxtil, alimentício, químico e farmacêutico, que utilizam em seus produtos e processos os mais variados tipos de corantes. Alguns corantes sintéticos utilizados em alimentos, como também em medicamentos e cosméticos, apresentam potencial toxicológico e por conta disto se faz necessária a realização de medidas espectrofotométricas para o controle de qualidade de tais compostos (SANTOS *et al.*, 2010). No Brasil, a utilização destes corantes é normatizada pela ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária) (BRASIL, 1977).

Diante da ampla aplicabilidade do espectrofotômetro, é importante se ter uma boa capacitação teórico-prática dos usuários, bem como métodos para avaliar os indicadores de qualidade do equipamento, garantindo assim, a obtenção de resultados experimentais ou clínicos satisfatórios.

O objetivo do presente estudo foi fomentar a experiência de alunos com a prática de biofísica, com as técnicas de estatística e com os métodos de obtenção de indicadores de qualidade, por meio da realização de experimentos laboratoriais utilizando espectrofotômetros, mais especificamente, analisando a dispersão das medidas de absorbância apresentadas por estes equipamentos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliados quatro espectrofotômetros da marca Kasuaki®, modelo IL-226 (Figura 1), rotineiramente empregados nas aulas práticas da disciplina Física e Biofísica 1, ministrada para os cursos das áreas de saúde e biológicas da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. Os números de série de cada equipamento são: 20152166 (equipamento 1); 20152167 (equipamento 2); 20152168 (equipamento 3); e 20152169 (equipamento 4).



Figura 1: Vista externa do espectrofotômetro, marca Kasuaki®, modelo IL-226.

Para as medidas de absorbância, foram utilizadas cubetas de vidro e uma solução aquosa do corante vermelho neutro a 0,00125%. Para calibrar o “zero” de absorbância utilizou-se como “branco” uma cubeta contendo água destilada. Todos os equipamentos foram ligados dez minutos antes de iniciar os testes, tempo requerido para estabilizá-los. Após este tempo, foi selecionado o comprimento de onda de 520 nm nos espectrofotômetros, o qual corresponde ao fotopico da substância utilizada, motivo para sua escolha.

Na tentativa de diminuir o erro das medidas experimentais, foi utilizada uma única cubeta para todas as medidas. Em cada

medida, adicionava-se 3 mL de vermelho neutro a 0,00125% à cubeta e em seguida a colocava no primeiro compartimento do porta-cubeta do primeiro equipamento. Após a leitura, retirava-se a cubeta e a colocava no segundo equipamento, este procedimento se repetia até chegar-se ao quarto equipamento.

Como foi observado que a localização lateral da cubeta no porta-cubeta altera de modo significativo os valores medidos para a absorbância, padronizou-se a posição de inserção da cubeta neste suporte, sendo todas as medidas realizadas com a cubeta posicionada na porção mais à esquerda do porta-cubeta (Figura 2). Ao final desta rodada de medidas, desprezava-se a amostra e adicionava-se uma nova amostra à cubeta, repetindo-se o procedimento descrito acima. Para realização de uma adequada análise estatística, foram feitas trinta e cinco medidas de absorbância em cada um dos equipamentos. Na leitura dos valores de absorbância foram consideradas três casas decimais. As medidas foram obtidas por quatro estudantes que receberam simultaneamente o mesmo treinamento de um instrutor técnico.



Figura 2: Posicionamento da cubeta no porta-cubeta.

Os dados obtidos foram inicialmente analisados, quanto à normalidade de sua distribuição, utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk (nível de significância de 0,05%) e estatística descritiva incluindo mediana, intervalo interquartil (IIQ) e intervalo de confiança da média para as amostras com distribuição normal. Na análise estatística foi utilizado o programa R CRAN v.3.4.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar o espalhamento dos dados obtidos foi utilizada a medida de dispersão da absorbância. Destaca-se que dispersão dos dados é um conceito que diz respeito a como e quanto os dados estão próximos ou distantes entre si.

Nos resultados obtidos foram encontrados quatro *outliers* (medidas atípicas), dois nas medidas realizadas com o equipamento 2 e dois nas medidas com o equipamento 3. Estes foram excluídos do conjunto de dados. Em sequência foram obtidos os seguintes resultados:

As medidas obtidas no equipamento 1 tiveram uma mediana de 0,6910. Como evidenciado na figura 3, os dados **não** apresentaram distribuição normal. Fato confirmado através do teste estatístico de Shapiro-Wilk (p -valor<0,05).

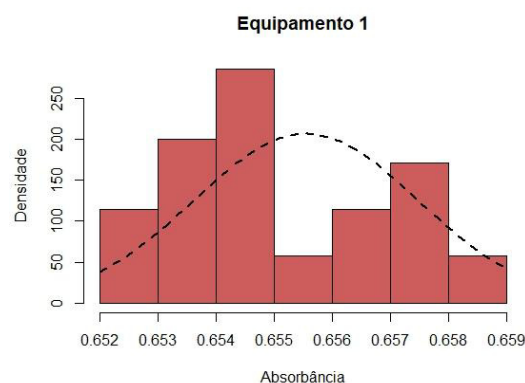


Figura 3: Distribuição de frequência das medidas obtidas com o equipamento 1 (n=35).

As medidas obtidas no equipamento 2 tiveram uma mediana de 0,6560. Como evidenciado na figura 4 e comprovado estatisticamente, os dados **não** apresentaram distribuição normal, (p -valor>0,05).

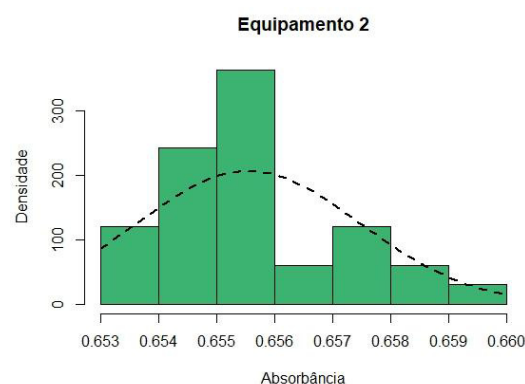


Figura 4: Distribuição de frequência das medidas obtidas com o equipamento 2 (n=33).

As medidas obtidas no equipamento 3 tiveram uma mediana de 0,6280. Como evidenciado na figura 5 e comprovado estatisticamente, os dados **apresentaram distribuição normal**, (p -valor>0,05). Com 95% de confiança pode-se dizer que a média da população de medidas do equipamento 3 (0,627727) encontra-se entre 0,62725 e 0,62819.

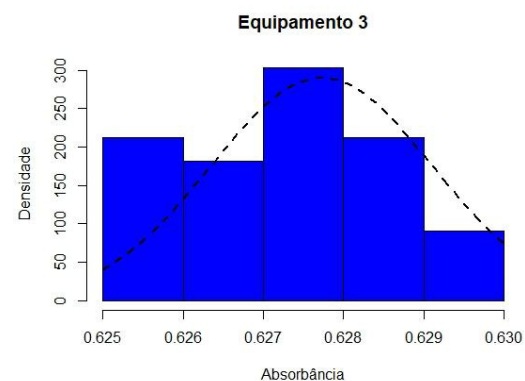


Figura 5: Distribuição de frequência das medidas obtidas com o equipamento 3 (n=33).

As medidas obtidas no equipamento 4 tiveram uma mediana de 0,6510. Como evidenciado na figura 6 e comprovado estatisticamente, os dados apresentaram **distribuição normal**, (p -valor>0,05). Com 95% de confiança pode-se dizer que a média da população de medidas do equipamento 4 (0,650428) encontra-se entre 0,64969 e 0,65115.

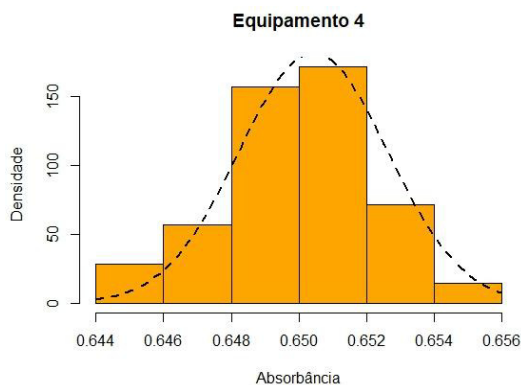


Figura 6: Distribuição de frequência das medidas obtidas com o equipamento 4 (n=35).

O quadro 1 mostra um resumo da análise estatística dos dados. Pode-se observar que o intervalo interquartil (IIQ) apresentou uma pequena amplitude, isto aconteceu como consequência da pouca dispersão das medidas.

Quadro 1: Análise estatística obtida para cada um dos quatro equipamentos.

Equipamentos	n	Mediana	Distribuição normal ?	IIQ
EQ1	35	0,6550	Não	0,003
EQ2	33	0,6560	Não	0,002
EQ3	33	0,6280	Sim	0,002
EQ4	35	0,6510	Sim	0,003

Na figura 7 pode-se visualizar de outra forma o comportamento da dispersão dos dados e suas respectivas medianas, representadas pela linhas mais escuras nas caixas do gráfico. Com destaque para a semelhança das medianas do equipamento 1 e do equipamento 2 e para uma discrepância da mediana do equipamento 3, em relação aos demais. Ressalta-se também o pequeno grau de dispersão das medidas realizadas pelos quatro equipamentos, como pode ser observado pelos intervalos interquartis.

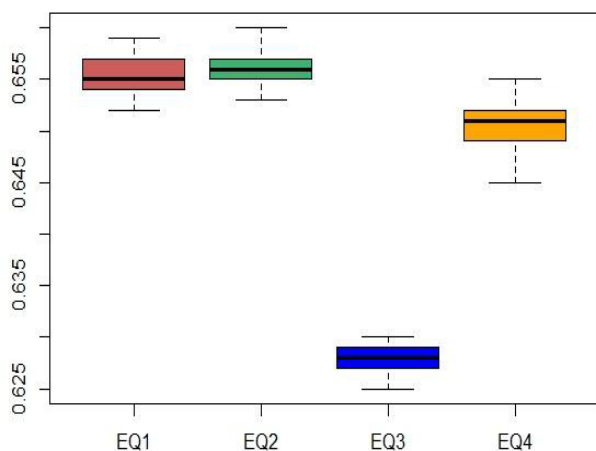


Figura 7: Boxplots comparativos dos dados obtidos com os equipamentos.

A literatura em estatística aponta o uso de *boxplot* como uma das alternativas para identificar-se valores discrepantes (*outliers*) (BARNETT; LEWIS, 1994; SCHWERTMAN; OWENSA; ADNANB, 2004; CARTER; SCHWERTMAN; KISER, 2009; LI *et al.*, 2016), que muito provavelmente são frutos de erros esporádicos nas medições. Na análise do *boxplots*, as caixas com amplo "corpo" demonstram valores espalhados para as medidas. Estes, quando não controlados, podem vir a influenciar no resultado final de testes estatísticos e consequentemente na conclusão da pesquisa.

Uma técnica que pode ser aplicada com o objetivo de complementar a avaliação dos dados é a análise de variância (ANOVA), ou ainda, seu equivalente para quando os dados não possuírem distribuição normal, o teste Kruskal Wallis. Em caso de constatação de diferença estatística em pelo menos um grupo (amostra), deve-se aplicar um teste para identificação do grupo ou dos grupos que diferem dos demais.

No presente estudo estes testes não foram aplicados pelo fato de existir um considerável número de medidas de mesmo valor (empates), consequentemente, não possibilitando estas análises complementares.

Contudo, todas estas ferramentas são recursos úteis para o conhecimento do funcionamento de equipamentos utilizados em pesquisa acadêmica. O contato de alunos de graduação com estes conceitos favorece a familiaridade com estas metodologias.

Entretanto, há necessidade de uma ampliação na análise das medidas realizadas por estes equipamentos, avaliando-se outras características, igualmente importantes, dos equipamentos como a exatidão, a sensibilidade e a reprodutibilidade. Os dados obtidos sugerem existir uma diferença na exatidão dos equipamentos. Assim sugerimos, como desdobramento deste estudo, a análise dos conceitos de exatidão, sensibilidade e reprodutibilidade. Cabe ressaltar que este não consistiu em um objetivo do presente trabalho.

CONCLUSÕES

O presente trabalho representa uma iniciativa positiva no sentido de promover a capacitação dos alunos de graduação da disciplina de Biofísica da UFPE, proporcionando uma avaliação crítica na obtenção de medidas com equipamentos de laboratório.

Os alunos constataram na prática que os equipamentos apresentaram medidas com pequena dispersão. Entretanto, observou-se a necessidade de investigação da exatidão destes equipamentos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, J.K.G.; AUED, N.; SOARES, F.Z.M.; JACQUES, L.B.; KAIZER, M.R.; MALLMANN, A. Avaliação de cor em compósitos com o espectrofotômetro Easyshade. *RFO*, Passo Fundo, v. 19, n. 1, p. 101-106, 2014.
- BARNETT V.; LEWIS, T. *Outliers in statistical data*. John Wiley, 1994.
- BRASIL, Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, Ministério da Saúde. Resolução - CNNPA nº 44, 1977.
- CARTER, N.J.; SCHWERTMAN, N.C.; KISER, T.L. A comparison of two boxplot methods for detecting univariate outliers which adjust for sample size and asymmetry. *Statistical Methodology*, v. 6, p. 604-621, 2009.
- CERRI, G.G.; JATENE, F.B.; NOBRE, M.R.; CUCE, BERNARDO, W.M. Introdução. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Disponível em <http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/texto_introdutorio.pdf> Acesso em 19 de maio de 2017.
- CISTERNAS, J.R.; VARGAS, J.; MONTE, O. *Fundamentos de Bioquímica Experimental*. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

DIESEL, P.G. Avaliação da cor de resinas compostas em meios e tempos de armazenamentos distintos usando dois espectrofotômetros. 07 de fevereiro de 2011, 61 folhas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. RS, Brasil, 2011.

HIRANO, Z.M.B.; SILVA FILHO, H.H.; MULLER, G.C.K.; SCHMIDT, S.R. Bioquímica - manual prático. Blumenau: EDIFURB, 2001.

LI, A.; FENG, M.; LI, Y.; LIU, Z. Application of Outlier Mining in Insider Identification Based on Boxplot Method. *Procedia Computer Science*, v. 91, p. 245-251, 2016.

MOTTA, V.T. Bioquímica Clínica para Laboratório - princípios e interpretações. 5ª edição. Rio de Janeiro: MedBook, 2009.

SANTOS, M.E.D.; DEMIATE, I.M.; NAGATA, N. Determinação simultânea de amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo em alimentos via espectrofotometria UV-VIS e métodos de calibração multivariada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, p. 903-909, 2010.

SCHWERTMANA, N.C.; OWENSA, M.A.; ADNANB, R. A simple more general boxplot method for identifying outliers. *Computational Statistics & Data Analysis*, v. 47, p. 165-174, 2004.

	EQ1	EQ2	EQ3	EQ4
1	0,654	0,653	0,626	0,645
2	0,657	0,656	0,627	0,648
3	0,658	0,657	0,629	0,648
4	0,659	0,658	0,629	0,649
5	0,658	0,658	0,628	0,649
6	0,657	0,657	0,629	0,651
7	0,654	0,655	0,626	0,649
8	0,655	0,655	0,627	0,648
9	0,654	0,654	0,627	0,649
10	0,652	0,653	0,625	0,646
11	0,656	0,656	0,629	0,65
12	0,654	0,655	0,627	0,649
13	0,654	0,655	0,627	0,65
14	0,654	0,655	0,626	0,65
15	0,655	0,656	0,626	0,65
16	0,655	0,655	0,628	0,651
17	0,654	0,655	0,628	0,651
18	0,655	0,656	0,628	0,652
19	0,655	0,656	0,627	0,652
20	0,655	0,656	0,629	0,651
21	0,655	0,656	0,628	0,65
22	0,655	0,656	0,628	0,651
23	0,655	0,656	0,629	0,651
24	0,655	0,656	0,629	0,651
25	0,656	0,656	0,63	0,652
26	0,658	0,659	0,628	0,655
27	0,658	0,659	0,626	0,654
28	0,653	0,656	0,625	0,651
29	0,652	0,654	0,63	0,649
30	0,653	0,655	0,628	0,648
31	0,658	0,66	0,628	0,653
32	0,657	0,658	0,628	0,652
33	0,657	0,658	0,63	0,653
34	0,658	-	-	0,653
35	0,659	-	-	0,654